

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
4 avril 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/26943 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 7/04,  
A61K 39/29, A61P 31/14, G01N 33/569

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/03012

(22) Date de dépôt international :  
28 septembre 2001 (28.09.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/12399 29 septembre 2000 (29.09.2000) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US)  
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Uni-  
versité, F-75007 PARIS (FR). CENTRE NATIONAL DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR];  
3, rue Michel-Ange, F-75016 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CERUTTI,

Martine [FR/FR]; 2997, route de Montèze, F-30380  
SAINT-CHRISTOL-LEZ-ALES (FR). GIRARD, Chris-  
tel [FR/FR]; 3, rue des Coquelicots, F-67230 ROSSFELD  
(FR). DEVAUCHELLE, Gérard [FR/FR]; 137, chemin  
de l'Espervette, F-30380 SAINT-CHRISTOL-LEZ-ALES  
(FR).

(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.;  
CABINET ORES, 6, avenue de Messine, F-75008 PARIS  
(FR).

(81) États désignés (national) : CA, US.

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, TR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

WO 02/26943 A2

(54) Title: PRODUCTION OF VIRUS-LIKE HCV PARTICLES IN THE CELLS OF INSECTS

(54) Titre : PRODUCTION DE PARTICULES PSEUDOVIRALES DE VHC EN CELLULES D'INSECTES

(57) Abstract: The invention concerns the production of virus-like particles of the hepatitis C virus, by expressing, in the cells of insects, the 5' non-coding region and the sequences coding for structural proteins of said virus in conditions not allowing the translation of the sequences coding for the structural proteins from an initiation codon of the 5' non-coding region.

(57) Abrégé : L'invention concerne la production de particules pseudovirales du virus de l'hépatite C, par expression, en cellules d'insectes, de la région 5' non-codante et des séquences codant pour les protéines structurales dudit virus dans des conditions ne permettant pas la traduction des séquences codant pour les protéines structurales à partir d'un codon d'initiation de la région 5' non-codante.

BEST AVAILABLE COPY

## PRODUCTION DE PARTICULES PSEUDOVIRALES DE VHC EN CELLULES D'INSECTES

L'invention est relative à la production de particules pseudovirales du virus de l'hépatite C (VHC).

5 Le virus de l'hépatite C a été identifié en 1989 [CHOO et al., Science, 244, 359-362, (1989)] par des techniques de biologie moléculaire. Ce n'est qu'ultérieurement que les particules virales ont été caractérisées [KAITO et al., J. Gen. Virol., 75, 1755-1760, (1994)] ; il s'agit de particules  
10 sphériques de 45 à 65 nm de diamètre, dont la densité en gradient de saccharose est de 1,03 à 1,2 g/ml.

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae* ; son génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 9,6 kb, comprenant successivement : une  
15 région 5' non codante (5'NCR) d'environ 340 nucléotides, un unique cadre ouvert de lecture codant pour une polyprotéine d'approximativement 3000 acides aminés, et une région 3' non codante (3'NCR) de 200 à 240 nucléotides.

L'organisation du génome peut être schématisée  
20 comme suit :  
5'NCR-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3'NCR.

Les protéines de structure C (protéine de capsid), E1, et E2 (protéines d'enveloppe), sont codées par la portion 5' du cadre de lecture ouvert ; le reste du cadre  
25 de lecture ouvert code la protéine p7, qui est un peptide hydrophobe de fonction inconnue, et les protéines non-structurales NS2 à NS5B, qui sont impliquées dans la réplication du génome et la maturation de la polyprotéine.

La région 5' non codante représente la séquence  
30 la plus conservée du génome du VHC ; sa longueur varie entre 341 et 349 nucléotides selon le génotype. Elle peut se replier pour former une structure secondaire complexe qui comprend quatre domaines : I (nucléotides 1-42), II (nucléotides 47-67), III (nucléotides 125-323), et IV  
35 (nucléotides 331-354), ainsi qu'un pseudo-nœud (nucléotides 305-311 et 325-331) et une structure en hélice [RIJNBRAND et LEMON, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 242, 85-116, (2000)]. Elle possède en outre un nombre variable (de 3 à 6 selon le

génotype) de codons AUG dont 2, situés aux positions 85 et 215, sont très conservés entre différents isolats de VHC, et également avec les pestivirus. Cette structure fonctionne comme un site interne d'entrée des ribosomes (IRES), et il a été observé [TSUKIYAMA-KOHARA et al., J. Virol., 66, 1476-1483, (1992) ; WANG et al., J. Virol., 67, 3338-3344, (1993) ; REYNOLDS et al., EMBO J., 14, 6010-6020, (1996)] qu'elle permettait d'initier la traduction de la polyprotéine dans plusieurs systèmes *in vitro* et *in vivo*.

10 L'étude du VHC, notamment dans le cadre du développement de vaccins ou de réactifs de diagnostic, est freinée par la difficulté d'obtention d'antigènes viraux en quantité suffisante. Bien que l'on parvienne à répliquer ce virus *in vitro* dans certaines cellules de mammifères  
15 (notamment des lymphocytes ou des hépatocytes), le taux de réplication demeure très faible.

Divers systèmes d'expression hétérologues ont donc été utilisés, et parmi ceux-ci, le système baculovirus/cellules d'insectes. Ce système, qui présente de  
20 nombreux avantages (notamment niveau d'expression élevé, innocuité vis-à-vis des vertébrés, et modifications co- et post-traductionnelles pour la plupart similaires à celles des cellules de mammifères), a été proposé pour l'expression de protéines de différents virus, ainsi que pour la production  
25 de particules pseudovirales non infectieuses.

Dans le cas du VHC, le système baculovirus/cellules d'insectes a été utilisé pour l'étude de l'expression de diverses protéines, structurales [MATSUURA et al., J. Virol., 66, 1425-1431, (1992) ; Virology, 205, 141-150, (1994) ; HSU et al., Hepatology 17, 763-771, (1993) ; LANDFORD et al., Virology, 197, 225-235, (1993) ; HÜSSY et al., Virus Res., 45, 45-57, (1996) ; J. Hepatol., 26, 1179-1186, (1997)], ou non-structurales [HIROWATARI et al., Arch. Virol., 133, 349-356, (1993) ; NISHIHARA et al.,  
35 Gene, 129, 207-214, (1993) ; OVERTON et al., J. Gen. Virol., 76, 3009-3019, (1995) ; SUZUKI et al., J. Gen. Virol., 76, 3021-3029, (1995) ; HWANG et al., Virology, 227, 439-446, (1997)]. Il a également été utilisé pour la production

d'antigènes du VHC à des fins d'études immunologiques [CHIBA et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4641-4645, (1991) ; CHIEN et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10011-10015, (1992) ; INOUE et al., J. Gen. Virol., 73, 2151-2154, (1992) ; BASSET et al., J. Virol., 73, 1118-1126, (1999)] ainsi que pour l'étude des interactions protéiques et de leur assemblage [WANG et al., Arch. Virol., 142, 2211-2223, (1997)] ; ces derniers auteurs ont notamment observé que l'IRES de la région 5' non-codante n'était pas fonctionnel dans les cellules d'insectes.

Cependant, les protéines virales ainsi obtenues ne s'assemblent pas en particules pseudovirales, et ne reproduisent donc pas certains des déterminants antigéniques du VHC natif.

Des travaux récents [BAUMERT et al., J. Virol., 72, 3827-3836, (1998) ; Demande PCT WO 98/21338], décrivent l'obtention de particules pseudovirales de VHC par l'expression dans un système baculovirus/cellules d'insectes, d'une construction comprenant une partie (les 81 derniers nucléotides) de la région 5' non-codante, ainsi que les séquences codant les protéines de structure C, E1 et E2 d'un VHC de génotype 1b. Les particules pseudovirales reconnues par des anticorps anti-VHC sont localisées dans les cellules infectées, où elles sont enfermées dans des vésicules intracytoplasmiques ; elles ont un aspect polymorphe, un diamètre variable de 40 nm à 60 nm, et après purification à partir des lysats de cellules infectées, une densité de 1,14 g/cm<sup>3</sup> à 1,18 g/cm<sup>3</sup>. Aucune sécrétion des particules pseudovirales dans le milieu de culture n'a été observée. BAUMERT et al. indiquent qu'il est possible, mais improbable que la portion de la 5'NCR contenue dans ces constructions joue un rôle dans l'efficacité de l'assemblage des particules et qu'il est plus probable que celle-ci dépend de l'isolat de VHC à partir duquel a été obtenu l'ADNc exprimé.

La présente invention a pour but de fournir des moyens reproductibles de production de particules pseudovirales de VHC dans un système baculovirus/cellules d'insectes. Pour atteindre ce but, les Inventeurs ont

entrepris de rechercher les régions du génome de VHC potentiellement impliquées non seulement dans l'expression des protéines virales, mais également dans leur assemblage en particules pseudovirales.

5 Dans un premier temps, pour étudier l'influence de la région 5' non-codante sur l'expression des protéines du VHC, les Inventeurs ont construit des baculovirus recombinants portant des inserts d'ADNc de VHC comprenant la séquence codant pour la partie structurale de la  
10 polyprotéine, précédée ou non par la région 5' non-codante.

Ils ont observé que :

- l'insert d'ADNc dépourvu de la région 5' non-codante est traduit en protéines, mais il n'y a pas d'autoassemblage de celles-ci ;
- 15 - l'insert d'ADNc contenant la région 5' non-codante est transcrit normalement en ARNm, mais n'est pas traduit, ce qui confirme les résultats rapportés par WANG et al., (1997, précité).

Les Inventeurs ont ensuite co-exprimé dans une  
20 même cellule, 2 constructions différentes : l'une comprenant la séquence codant pour les protéines structurales, et dépourvue de la séquence de la région 5' non-codante, et pouvant donc être traduite en protéines de structure de VHC, et l'autre comprenant la séquence codant pour les protéines  
25 structurales précédée de la séquence de la région 5' non-codante, et ne pouvant donc pas être traduite en protéines de structure de VHC.

Ils ont alors constaté que de manière  
surprenante, cette expression en trans de la 5'NCR et des  
30 protéines structurales produit, à l'intérieur de la cellule, des particules pseudovirales de morphologie et de densité similaires à celles du VHC, ce qui permet de supposer que la région 5' non-codante joue un rôle dans l'assemblage des particules pseudovirales.

35 Les Inventeurs ont alors cherché à modifier la région 5' non-codante de manière à supprimer des codons AUG présents dans cette région et susceptibles d'interférer avec la traduction de la polyprotéine, permettant ainsi de

la culture de la cellule infectée et la récolte des particules pseudovirales de VHC à l'issue de ladite culture, à partir de ladite cellule ou de son milieu de culture.

5                    Selon une disposition préférée de ce mode de mise en œuvre, pour obtenir des particules pseudovirales en quantité plus importante, on effectue la récolte des particules pseudovirales après au moins 48 heures de culture, de préférence après 72 heures de culture.

10                   Pour la récolte des particules pseudovirales de VHC à partir de la cellule infectée, on procède à la lyse de ladite cellule, et à la purification des particules pseudovirales à partir du lysat obtenu. L'identification de la ou des fraction(s) contenant les particules pseudovirales  
15 peut s'effectuer aisément à l'aide d'anticorps anti-VHC.

                  On peut traiter le lysat par un détergent, avantageusement un détergent non-ionique, à une concentration comprise de préférence entre 0,5 et 1%, afin de séparer les particules pseudovirales des membranes qui leurs sont  
20 associées.

                  Pour la purification des particules pseudovirales, on utilisera des méthodes classiques telles que des centrifugations successives et/ou une centrifugation sur gradient de saccharose ou tout autre procédé équivalent.

25                   Par exemple, lorsque la purification est effectuée sans traitement du lysat cellulaire par un détergent, les particules pseudovirales de VHC peuvent être récupérées après centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose, dans une fraction dont la densité est d'environ  
30 1,15 à 1,18 g/ml ; ces particules comprennent, outre la protéine de capsid, les protéines d'enveloppe E1 et E2. Lorsque la purification est effectuée après traitement du lysat cellulaire par un détergent, (par exemple NP40 à 1% final), les particules pseudovirales de VHC peuvent être  
35 récupérées après centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose, dans une fraction dont la densité est d'environ 1,23 à 1,26 g/ml ; ces particules sont dépourvues des protéines d'enveloppe E1 et E2. Leur densité est similaire à

celle de la nucléocapside du VHC qui a été estimée à 1,25 g/ml [MIYAMOTO et al., J. Gen. Virol., 73, 715-718, (1992)], après traitement au NP40 de particules virales extraites d'échantillons de plasma provenant de patients infectés.

Avantageusement, dans le cadre de la deuxième variante de la présente invention, on peut récolter les particules pseudovirales de VHC à partir du milieu de culture ; du fait qu'il n'est pas nécessaire de procéder à la lyse préalable des cellules, l'extraction et la purification des particules pseudovirales sont facilitées, et peuvent s'effectuer dans des conditions moins drastiques, assurant une meilleure préservation de leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et antigéniques.

Pour la récolte des particules pseudovirales de VHC à partir du milieu de culture, on procède à la collecte dudit milieu, et à la purification des particules pseudovirales à partir de celui-ci.

La collecte du milieu de culture peut s'effectuer par tous moyens connus en eux-mêmes, permettant de séparer ledit milieu des cellules infectées, par exemple par centrifugation ou filtration.

Préalablement à la purification des particules pseudovirales de VHC, on peut traiter le milieu de culture ainsi collecté par un détergent, comme indiqué ci-dessus pour la purification à partir du lysat. La purification des particules pseudovirales s'effectue ensuite également par des méthodes classiques, similaires à celles mentionnées ci-dessus. L'identification de la ou des fraction(s) contenant les particules pseudovirales peut s'effectuer à l'aide d'anticorps anti-VHC comme indiqué ci-dessus.

Comme dans le cas des particules pseudovirales obtenues à partir du lysat cellulaire, celles obtenues à partir du milieu de culture peuvent être récupérées après centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose, sous forme de particules possédant les protéines d'enveloppe E1 et E2, et dans une fraction dans une fraction dont la densité est d'environ 1,15 à 1,18 g/ml lorsque le milieu n'a pas été

traité par un détergent, et sous forme de particules dépourvues des protéines d'enveloppe E1 et E2, et dans une fraction dont la densité est d'environ 1,23 à 1,26 g/ml lorsque le milieu a été traité par un détergent.

5 Des particules pseudovirales de VHC dépourvues des protéines d'enveloppe E1 et E2 peuvent également être obtenues en traitant par un détergent non-ionique des particules pseudovirales possédant ces protéines ; dans ce cas, on utilisera ledit détergent à une concentration plus  
10 faible que celle employée pour le traitement du lysat cellulaire ou du milieu de culture. Avantageusement, on utilisera une concentration en détergent de l'ordre de 0,1 à 0,5%.

La présente invention a également pour objet les  
15 particules pseudovirales de VHC susceptibles d'être obtenues par un procédé conforme à l'invention, et notamment des particules pseudovirales présentant les caractéristiques suivantes :

- une nucléocapside de morphologie icosaédrique,  
20 et de diamètre de 30 nm environ ;

- une densité sur gradient de saccharose d'environ 1,15 à 1,18 g/ml lorsqu'elles sont obtenues à partir d'un milieu de culture ou d'un lysat cellulaire n'ayant pas été traité par un détergent ;

25 - une densité sur gradient de saccharose d'environ 1,23 à 1,26 g/ml lorsqu'elles sont obtenues à partir d'un milieu de culture ou d'un lysat cellulaire ayant été traité par un détergent.

La présente invention a également pour objet des  
30 outils de production des particules pseudovirales de VHC conformes à l'invention, et notamment :

- toute séquence d'acide nucléique comprenant une séquence (a') ou (a''') suivie d'une séquence (b) telles que définies ci-dessus, ainsi que toute cassette d'expression ou  
35 vecteur d'expression comprenant ladite séquence placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur de baculovirus ;

- tout vecteur recombinant contenant une cassette d'expression comprenant une séquence (a), (a'), (a'') ou



(a''') sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur de baculovirus, et une cassette d'expression comprenant une séquence (b) sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur de baculovirus ;

- 5                   - toute cellule d'insecte exprimant soit une séquence (a') ou (a''') suivie d'une séquence (b) sous contrôle transcriptionnel d'un même promoteur de baculovirus, soit une séquence (a), (a'), (a'') ou (a''') sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur de baculovirus, et  
10 une séquence (b) sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur de baculovirus.

Les particules pseudovirales de VHC conformes à l'invention peuvent être utilisées notamment pour la préparation de vaccins anti-VHC, ainsi que pour la  
15 préparation de réactifs de diagnostic, par exemple pour détecter la présence d'anticorps anti-VHC dans des échantillons de sérum. Elles peuvent également être utilisées pour la production d'anticorps anti-VHC.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se  
20 réfère à des exemples non-limitatifs de construction et de mise en oeuvre de vecteurs d'expression conformes à l'Invention.

Les protocoles utilisés dans les exemples qui  
25 suivent font appel à des techniques classiques du génie génétique, telles que celles décrites par SAMBROOK et al. [Molecular cloning : A Laboratory Manual ; Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)], ou par O'REILLY et al. [Baculovirus Expression Vectors : A Laboratory Manual ;  
30 Freeman and Cie, New York, (1994)] pour la manipulation de l'ADN de baculovirus. Les conditions particulières à chaque expérimentation sont, s'il y a lieu, précisées dans l'exemple correspondant.

**EXEMPLE 1 : EFFET DE LA SEQUENCE 5' NON CODANTE SUR LA  
35 TRADUCTION DE LA REGION STRUCTURALE DE LA POLYPROTEINE DE VHC**

Pour étudier le rôle de la région 5' non codante (5'NCR) de VHC sur la morphogénèse des particules virales, 2

baculovirus recombinants dénommés respectivement AcSLP10-5'NCR-E1 et AcSLP10-C-E1 ont été construits.

Le baculovirus AcSLP10-5'NCR-E1 comprend la séquence codant les protéines C et E1 de VHC ainsi que la région 5'NCR ; le baculovirus AcSLP10-C-E1 comprend uniquement la région codant les protéines C et E1 de VHC et est dépourvu de la région 5'NCR.

Ces baculovirus ont été construits à partir du plasmide pMINK, qui comprend l'ADNc de la souche VHC-H génotype 1a [INCHAUSPE et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10292-10296, (1991)].

L'organisation de la région du génome de la souche VHC-H qui comprend les séquences codant pour les protéines structurales est illustrée par la Figure 1 ; les positions des sites de clivage de la polyprotéine par les signalases cellulaires sont indiquées sous le diagramme.

Dans les exemples qui suivent, les positions des nucléotides du génome de VHC-H sont indiquées par référence au site d'initiation de la traduction de polyprotéine, le « A » du codon d'initiation représentant la position +1.

Les baculovirus AcSLP10-5'NCR-E1 et AcSLP10-C-E1 ont été construits à l'aide des vecteurs de transfert p118 dérivés du plasmide pGm8022 [CHAABIHI et al., J. Virol., 67, 2664-2671, (1993)].

#### 25 Construction du baculovirus AcSLP10-C-E1 :

##### Plasmide p118-C-E1 :

La séquence comprenant les nucléotides -26 à +267 par rapport à l'ATG de la protéine C de VHC-H a été amplifiée en utilisant les amorces suivantes :

30 Amorce sens : 5'-CCGGGAGCTCTCGTAGATCTTGCACC-3'

(les nucléotides qui ont été mutés pour créer un site SacI et un site BglI sont indiqués en caractères gras).

Amorce antisens : 5'-CTCATTGCCATAGAGGGGCC-3'

et le plasmide pMINK comme matrice.

35 Après digestion avec BglII et Asp718, le fragment résultant (qui comprend les nucléotides +1 à +239) a été cloné dans un plasmide pUC modifié (un site BglIII a été

inséré à la place du site *SacI*), pour donner le plasmide pUC-cΔ. Un fragment Asp718-SalIII (nucléotides +240 à +1141) codant pour la portion C-terminale de la capsid et pour les 191 premiers acides aminés de E1 a été excisé de pMINK et

5 inséré dans les sites Asp718-AslI du plasmide pUC-CA. Le dernier codon de E1 et un codon stop ont été enfin insérés par l'intermédiaire d'un lieur SalI avant le sous-clonage dans le vecteur de transfert p118. Le lieur SalI a été reconstitué par hybridation des 2 oligonucléotides suivants :

10 5'-GTCGACGCGTAAAGATCTGAGCT-3' et  
5'-CAGATCTTTACGCGTCGACAGCT-3'.

Le plasmide résultant, dénommé p118-C-E1, code pour la capsid et pour la totalité de la glycoprotéine E1 (nucléotides +1 à +1146).

15 Construction du baculovirus AcSLP10-5'NCR-E1 :

Plasmide p118-5'NCR-E1 :

Un fragment BamHI de 1369 pb contenant la région 5' non-codante (341 nucléotides), ainsi que la séquence codant la protéine de capsid et 149 acides aminés de la glycoprotéine E1 (nucléotides +1 à +1016) de VHC a été inséré

20 dans le site unique BglIII du plasmide p118 stop (p118 avec un codon stop situé en aval du site BglIII) pour donner un plasmide dénommé p118-5'NCR-E1.

Les plasmides p118-C-E1 et p118-5'-NCR-E1 sont

25 schématisés sur la Figure 2. Les virus recombinants sont préparés par recombinaison entre p118-C-E1 ou p118-5'-NCR-E1 et de l'ADN purifié du baculovirus modifié AcSLP10 [CHAABIHI et al., 1993, précité]. Le baculovirus AcSLP10 est un baculovirus modifié qui possède un seul promoteur tardif fort

30 (P10) suivi par la séquence codant la polyédrine. La sélection et la purification des virus recombinants est effectuée selon la procédure classique décrite par SUMMERS et SMITH [Texas Agric. Exp. Stat. Bull., 1555, 1-56, (1987)].

Des cellules de *Spodoptera frugiperda* (cellules Sf9, VAUGHN et al., In Vitro Cell Dev. Biol., 13, 213-217, 1977) sont cultivées à 28°C dans du milieu TC100 (GIBCO) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal. Pour l'infection,

35

les cellules ( $4 \times 10^6$  par flacon de  $25 \text{ cm}^2$ ) sont inoculées avec la suspension virale à raison de 1 à 10 unités formant plaque (UFP) par cellule. Après 1 heure d'adsorption à température ambiante, l'inoculum viral est enlevé, et du milieu de culture frais est ajouté. Les cellules sont ensuite incubées à  $28^\circ\text{C}$ .

Les protéines exprimées par les cellules Sf9 infectées avec AcSLP10-C-E1, AcSLP10-5'NCR-E1 ou avec le virus AcMNPV de type sauvage ont été analysées par électrophorèse et immuntransfert selon le protocole suivant :

Les cellules infectées sont récoltées 48 h p.i. (post-infection), lavées avec du tampon PBS froid (phosphate-buffered Saline), et resuspendues dans du tampon d'électrophorèse [LAEMMLI, Nature, 277, 680-684, (1970)]. Les échantillons de protéines sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 12,5%; en conditions dénaturantes, et en présence de dodécyl sulfate de sodium. Les protéines sont alors transférées sur un filtre de nitrocellulose (SCHLEICHER et SCHUELL ; BAS 85,  $0,45 \mu\text{m}$ ). La membrane est colorée au rouge Ponceau (Ponceau-S ; SIGMA, St Louis, Mo), puis bloquée avec une solution de TBS ( $0,05 \text{ M}$  Tris-HCl ( $\text{pH } 7,4$ )  $0,2 \text{ M}$  NaCl) contenant 0,05% de TWEEN 20 et 5% de poudre de lait écrémé (TBS sat).

La protéine de capsid de VHC est détectée en utilisant l'anticorps monoclonal de souris anti-capsid 27D5C5 (1:500 en TBS-sat) ou le sérum polyclonal de lapin anti-capsid #57 (1:500 en TBS-sat) comme anticorps primaire et un sérum de lapin anti-immunoglobuline G de souris conjugué à la peroxydase (SIGMA) ou un sérum de chèvre anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase (SIGMA) comme anticorps secondaire (1:1000 en TBS-sat).

Les glycoprotéines E1 et E2 sont détectées en utilisant un sérum polyclonal de lapin anti-E1 (1:200 en TBS-sat) ou un sérum polyclonal de lapin anti-E2 (1:500 en TBS-sat) comme anticorps primaire et un sérum de chèvre anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase comme anticorps secondaire (1:10000 en TBS sat). Les transferts ont également été révélés en utilisant des sérums humains

anti-VHC (1:500 en TBS-sat) contenant des anticorps contre les 3 protéines structurales et un sérum de chèvre anti-immunoglobuline humaine conjuguée à la phosphatase alcaline (SIGMA) comme anticorps secondaire (1:10000 en TBS-sat).

Les bandes immunoréactives ont été visualisées en utilisant comme agent chromogène soit du 1-amino-3-éthyl carbazole, soit un mélange de sel de Nitrobleu de Tétrazolium et de sel de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine.

Les résultats de cette analyse sont les suivants :

L'analyse des protéines exprimées dans les cellules infectées avec AcSLP10-C-E1 montre la présence d'une protéine de 21 kDa, et en moindre quantité, d'une protéine de 23 kDa qui correspond probablement à la protéine de capsid non clivée à son extrémité C-terminale. 3 produits additionnels mineurs de poids moléculaire plus faible (16 et 18 kDa) ou plus élevé (22 kDa), sont révélés avec le sérum humain anti-VHC. On observe aussi l'accumulation d'un produit de 42-55 kDa qui résulte probablement d'une maturation inefficace de la polyprotéine précurseur CE-1. En fait, ce précurseur est marqué avec l'anticorps anti-E1.

L'analyse des protéines exprimées dans les cellules infectées avec AcSLP10-5'NCR-E1 ne révèle aucune production de la capsid ou de la glycoprotéine E1.

Dans les cellules témoins infectées par le baculovirus AcMNPV de type sauvage, on n'observe aucune production de protéines reconnues par des anticorps dirigés contre les protéines de VHC.

Pour vérifier si l'absence d'expression des protéines de VHC dans les cellules infectées avec AcSLP10-5'NCR-E1 est due à une déficience au niveau de la transcription ou bien au niveau de la traduction, les ARN messagers produits par les constructions AcSLP10-C-E1 et AcSLP10-5'NCR-E1 ont été analysés par transfert de Northern selon le protocole suivant :

L'ARN total a été isolé à partir des cellules infectées 48 h après infection, en utilisant le réactif

TRIZOL (GIBCO BRL), suivant le protocole préconisé par le fabricant. Après extraction au chloroforme et précipitation à l'alcool isopropylique, l'ARN total est resuspendu dans de l'eau dépourvue de RNase et quantifié par spectrophotométrie.

- 5 Après addition de tampon d'échantillon ARN (PROMEGA), 10 µg de chaque échantillon sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% en conditions non-dénaturantes et transférés sur membrane de nylon (ROCHE). Les transferts sont hybridés avec une sonde de 417 bp (nucléotides 369 à 785 de la
- 10 séquence codant la polyprotéine de VHC) radio-marquée au <sup>32</sup>P.

Cette sonde recouvre la séquence codant la partie C-terminale de la capsid et la partie N-terminale de E1.

- Un transcrit de la taille attendue (environ 750 nucléotides) est détecté, aussi bien dans les cellules
- 15 infectées avec AcSLP10-5'NCR-E1, que dans celles infectées avec AcSLP10-C-E1. Ces données indiquent que la non-expression des protéines de VHC dans les constructions contenant la région 5'NCR reflète une déficience au niveau de la traduction de l'ARNm en protéines.

- 20 L'état de glycosylation des protéines de VHC produites par AcSLP10-C-E1 a été étudié en cultivant les cellules infectées en présence de tunicamycine, un antibiotique d'origine fongique qui bloque la N-glycosylation. La tunicamycine (concentration finale :
- 25 10 µg/ml) a été ajoutée au milieu de culture des cellules 7 h après l'infection. Les cellules infectées sont récoltées 52 h après l'infection, et les échantillons de protéines sont analysés par immuntransfert comme décrit ci-dessus. A titre de contrôle, des cellules infectées ont été cultivées dans
- 30 les mêmes conditions, mais sans tunicamycine. Dans ces conditions, les formes de haut poids moléculaire de E1 et de C-E1 ne sont plus observées. Dans tous les cas, ces protéines de structure ne sont pas non plus retrouvées dans les milieux de culture des cellules.

- 35 L'observation au microscope électronique de cellules Sf9 infectées par AcSLP10-C-E1 révèle un matériel réticulé dense, à répartition périnucléaire caractéristique des protéines associées au réticulum endoplasmique. Le

marquage de cellules avec le sérum humain anti-VHC montre une colocalisation de ces matériaux immunoréactifs avec des structures intracytoplasmiques denses, ce qui indique que les protéines exprimées sont retenues dans le réticulum endoplasmique.

En revanche, les cellules infectées avec AcSLP10-5'NCR-E1 ne montrent que les caractéristiques des cellules infectées par un baculovirus recombinant, c'est-à-dire : une hypertrophie nucléaire, la présence de grandes quantités de virus dans le noyau, et l'absence de structures de type polyédrique ou P10. Aucune rétention réticulée cytoplasmique ou formation d'agrégat n'est observée, et aucune protéine intracellulaire n'est marquée avec le sérum humain anti-VHC, ce qui confirme les résultats de l'immuntransfert.

#### **EXEMPLE 2 : EFFETS EN TRANS DE LA REGION 5' NON-CODANTE SUR LA MULTIMERISATION DE LA PROTEINE DE CAPSIDE DE VHC**

Une éventuelle interaction entre la 5'NCR et la protéine de capsid a été étudiée par co-expression des 2 baculovirus AcSLP10-5'NCR-E1 et AcSLP10-C-E1, combinant ainsi un transcrit non traduisible en protéines de structure de VHC contenant une 5'NCR avec un transcrit traduisible en protéines de structure de VHC dépourvu de 5'NCR.

Des cellules Sf9 ont été infectées avec AcSLP10-C-E1 seul, ou bien co-infectées avec AcSLP10-C-E1 et AcSLP10-5'NCR-E1, selon le protocole décrit à l'Exemple 1 ci-dessus.

48 ou 72 h après l'infection, les cellules sont resuspendues dans du tampon faiblement salin (10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% NP40) froid, en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (O-COMLETE, ROCHE), et broyées dans un potter (BIOBLOCK SCIENTIFIC).

Après centrifugation à faible vitesse ( $10 \times 10^3 g$  pendant 10 minutes à 4°C), le surnageant est déposé sur un gradient linéaire de saccharose (20 à 60% en poids dans du tampon TEN : 50 mM Tris HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA)

et soumis à une centrifugation isopycnique pendant 24 h à 4°C et 150 000 g. Pour certaines expériences, 1% de NP40 ont été ajoutés aux extraits bruts de protéines avant leur dépôt sur le gradient de saccharose.

5 Des fractions de 500 ml sont collectées et analysées par immuntransfert, comme décrit à l'Exemple 1 ci-dessus.

Les résultats de l'analyse par centrifugation isopycnique sur gradient de saccharose, montrent que la  
10 distribution de la protéine de capsid et du polypeptide C-E1 sur le gradient diffère selon que les extraits ont été préparés à partir des cellules infectées avec AcSLP10-C-E1 seul ou bien à partir des cellules co-infectées avec AcSLP10-C-E1 et AcSLP10-5'NCR-E1. Quand elles sont exprimées  
15 dans des cellules infectées uniquement avec AcSLP10-C-E1, les protéines C et C-E1 sont présentes dans les fractions sédimentant à une densité de 1,21 à 1,26 g/ml ; quand elles sont exprimées dans les cellules co-infectées avec les 2 constructions, elles sont présentes dans les fractions  
20 sédimentant à une densité de 1,15 à 1,18 g/ml.

Lorsque l'extrait brut est traité avec un détergent nonionique doux (NP-40, 1%) préalablement à son analyse sur gradient de saccharose, les protéines C et C-E1 sont présentes dans les fractions sédimentant à une densité  
25 plus élevée : 1,24-1,26 g/ml.

L'analyse en microscopie électronique de cellules co-infectées avec AcSLP10-5'NCR-E1 et AcSLP10-C-E1 montre une distribution réticulée du matériel dense similaire à celle décrite ci-dessus. L'observation à fort grossissement de la  
30 région cytoplasmique des cellules aux phases tardives de l'affection montre des particules pseudo-virales de taille et de forme variables. Ces particules sont entourées de protubérances qui peuvent être constituées soit de complexes de protéines structurales, soit de structures  
35 pseudo-ribosomales associées.

Le marquage avec un anticorps polyclonal anti-capsid de cellules infectées préalablement perméabilisées au détergent montre une colocalisation de la



protéine de capside de VHC avec ces particules. Des cellules infectées avec le baculovirus de type sauvage ou avec d'autres baculovirus recombinants exprimant une ou deux protéines de VHC sans la protéine de capside ne montrent  
5 jamais de distribution similaire. Ces résultats confirment que la protéine de capside de VHC est capable de s'auto-assembler dans les cellules Sf9 lorsqu'elle est exprimée avec seulement une partie de l'ARN VHC, pourvu qu'il comporte tout ou partie de la 5'NCR.

10 **EXEMPLE 3 : EFFETS DE LA MUTATION DES CODONS AUG DE LA REGION 5' NON-CODANTE DE VHC SUR LA TRADUCTION DES PROTEINES DE STRUCTURE ET LA FORMATION DE PARTICULES PSEUDO-VIRALES**

Pour étudier le rôle potentiel de la 5'NCR sur l'assemblage des protéines structurales lorsqu'elle est  
15 placée en position *cis*, un baculovirus recombinant dénommé AcPH-5'NCRm-NS2Δ a été construit. Ce baculovirus comprend la séquence codant pour la totalité des protéines de structure de VHC, précédé par une 5'NCR mutée par suppression de 5 codons AUG silencieux.

20 **Construction du baculovirus pGmAc5'NCRm-NS2Δ**

Ce virus est construit en utilisant le vecteur de transfert pGmAcl18. Ce vecteur possède un lieu *Bgl*III inséré dans une délétion au niveau du gène de la polyhédrine s'étendant des nucléotides -10 à +483 (la position +1  
25 correspondant au 1<sup>er</sup> nucléotide du codon d'initiation ATG de la polyhédrine). La délétion dans la séquence du promoteur de la polyhédrine permet d'atténuer le niveau d'expression du gène hétérologue.

**Construction du plasmide pGmAc-5'NCRm-NS2Δ :**

30 Un fragment d'ADN de 256 bp contenant une région 5'NCR modifiée de VHC présentant des mutations dans les 5 codons AUG silencieux est construit en utilisant un ensemble de 14 oligonucléotides se recouvrant. La position du 1<sup>er</sup> nucléotide de chaque codon AUG dans la région 5' non-codante  
35 de VHC est respectivement de -328, -310, -257, -246 et -127 par rapport au A(+1) du codon d'initiation de la polyprotéine de VHC. Les mutations ont été choisies de manière à créer des

sites commodes pour d'éventuelles étapes de clonage ultérieures ; en revanche, il n'a pas été tenté de préserver la structure secondaire de la région 5'NCR. Les positions des mutations sont indiqués dans le Tableau I ci-dessous :

5

Tableau I

position AUG	Séquence originale	Séquence mutée
-328	ug AUG gg	ug AUC gg
-310	cc AUG aa	cc AUC aa
-257	cc AUG gc	cc UAG gc
-246	gu AUG ag	gu AUC ag
-127	ca AUG cc	cg AGG cc

Un fragment *NheI-BglIII* de 2987 bp (nucléotides -92 à +2895) contenant 93 bp de la 5'NCR de VHC de type sauvage, ainsi que les séquences codant pour les protéines C, E1, E2-P7 et les 158 premiers acides aminés de NS2, a été introduit en aval de la 5'NCR mutée dans le vecteur de transfert pGmAc118. Un lieu *BglIII* inséré dans le gène NS2 a introduit un codon stop en phase. Le plasmide résultant est dénommé pGmAc-5'NCRm-NS2Δ. Ce plasmide est schématisé sur la Figure 3.

15 Pour la préparation du baculovirus AcPH5'NCRm-NS2Δ, des cellules Sf2 sont co-transfectées avec l'ADN du plasmide pGmAc-5'NCRm-NS2Δ et l'ADN de baculovirus de type sauvage AcNMPV, par lipofection (DOTAP ; ROCHE).

Des cellules SF9 sont infectées avec le virus AcPH5'NCRm-NS2Δ, et cultivées selon le protocole décrit à l'Exemple 1 ci-dessus. Des lysats cellulaires ont été préparés 72 h après l'infection et les protéines de ces lysats ont été analysées par immun-transfert, selon le protocole décrit à l'Exemple 1 ci-dessus, en utilisant ou bien l'anticorps monoclonal anti-capside de VHC 27D5C5, ou bien le sérum polyclonal anti-E1, ou bien le sérum polyclonal anti-E2, ou bien le sérum humain anti-VHC.

Les résultats de cette analyse montrent que la traduction des protéines structurales est restaurée. Deux produits immuno-réactifs majeurs avec des poids moléculaires de 21 et 23 kDa, correspondant aux deux formes différentes de la protéine de capsid sont révélés par l'anticorps anti-capsid. Deux espèces mineures de 16 et 28 kDa sont également détectées en plus faible quantité. L'anticorps

polyclonal anti-E1 réagit avec plusieurs bandes comprises entre 21 et 35 kDa correspondant probablement à des variants de glycosylation de la glycoprotéine E1.

Des bandes additionnelles distribuées entre 35 et 110 kDa peuvent représenter des polypeptides CE-1, E1-E2 ou C-E1-E2 non clivés et partiellement glycosylés.

Des variants de glycosylation de la glycoprotéine E2 ont été révélés en utilisant un anticorps polyclonal anti-E2, dans une zone de poids moléculaire allant de 40 à 66 kDa. Les deux glycoprotéines E1 et E2, et dans une moindre mesure la protéine de capsid ont également été détectées dans le gel de tassement, sous forme d'agrégats insolubles.

L'observation en microscopie électronique des cellules infectées avec le baculovirus recombinant AcPH-5'NCRm-NS2Δ montre un cercle périnucléaire de matériel très dense résultant probablement de l'accumulation de protéines de structure de VHC associées au réticulum endoplasmique. L'immunomarquage avec le sérum humain anti-VHC de cryo-sections de cellules infectées confirme la localisation des protéines de VHC dans cette zone du cytoplasme. Un faible marquage est également observé dans le noyau.

L'analyse par centrifugation isopycnique sur gradient de saccharose, selon le protocole décrit à l'Exemple 2 ci-dessus, montre que les protéines reconnues par le sérum humain anti-VHC sédimentent dans des fractions de densité 1,14 à 1,18 g/ml. Dans ces conditions, le produit principalement détecté est la protéine de capsid, essentiellement sous forme mature p21.

Le traitement des extraits cellulaires avec du NP40 (concentration finale de 1% dans le tampon de lyse cellulaire) provoque un déplacement de la densité des particules, de 1,14-1,18 g/ml à 1,23-1,26 g/ml.

L'observation en microscopie électronique, après coloration négative, de ces fractions reconnues par l'anticorps anti-VHC montre la présence de particules icosaédriques d'environ 30 nm de diamètre.

**EXEMPLE 4 : EFFET DE LA MUTATION DES CODONS AUG DE LA REGION 5' NON-CODANTE DE VHC SUR LA FORMATION DE PARTICULES PSEUDOVIRALES EXTRACELLULAIRES**

Des surnageants de cultures de cellules  
5 co-infectées avec AcSLP10-5'NCR-E1 et AcSLP10-C-E1, ou infectées avec AcPH-5'NCRm-NS2Δ seul, ont été concentrés par centrifugation à 150000 g et analysés par centrifugation isopycnique sur gradient de saccharose selon le protocole suivant :

10 Les particules virales présentes dans le surnageant de culture sont isolées comme suit : après une centrifugation à faible vitesse (10 min. à 4°C et 1000 g), le surnageant est récupéré et soumis à une seconde centrifugation de 1 à 2 h à 4°C et à 150000 g. Le culot de  
15 cette deuxième centrifugation est resuspendu dans du tampon TEN (contenant des inhibiteurs de protéase) et soumis à une centrifugation isopycnique sur gradient de saccharose. Dans ces conditions, le surnageant est concentré de 20 à 100 fois. Des fractions de 500 µl sont récoltées à partir du sommet du  
20 gradient et analysées comme décrit dans l'Exemple 2 ci-dessus.

Aucun produit réagissant avec les anticorps anti-VHC n'est détecté dans les surnageants de culture de cellules co-infectées avec AcSLP10-5'NCR-E1 et AcSLP10-C-E1 ;  
25 en revanche, dans les surnageants de cellules infectées avec AcPH-5'NCRm-NS2Δ on détecte des fractions réagissant avec les anticorps anti-VHC. La principale fraction réagissant avec les anticorps anti-VHC sédimente à une densité d'environ 1,18 g/ml et réagit également avec les anticorps anti-capside  
30 et dans une moindre mesure, avec les anticorps anti-E1 et anti-E2.

Le fait que le signal obtenu avec les deux anticorps anti-enveloppe soit plus faible que celui observé avec les anticorps anti-capside peut refléter une  
35 incorporation plus faible des glycoprotéines E1 et E2 dans ces particules.

Le traitement des particules par du NP40 1% préalablement à la centrifugation sur gradient de saccharose provoque le même déplacement de densité (de 1,18 à 1,25 g/ml) que celui observé dans le cas des particules obtenues à  
5 partir des extraits cytoplasmiques.

## REVENDEICATIONS.

- 1) Procédé d'obtention de particules pseudovirales de VHC, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression simultanée, dans une même cellule d'insecte, et sous forme de transcrits séparés, des séquences nucléotidiques suivantes :
- une séquence non-codante choisie parmi :
    - a) la région 5' non-codante d'un VHC ;
    - a') une séquence dérivée de la séquence a) par élimination d'un ou plusieurs des codons d'initiation de la traduction présents dans ladite séquence ;
    - a'') une séquence constituée par au moins une portion de la séquence a) ;
    - a''') une séquence constituée par au moins une portion de la séquence a') ;
  - une séquence (b) codant au moins pour les protéines C, E1, et E2 d'un VHC, et dépourvue de la région 5' non-codante dudit VHC ;
- et la récupération des particules pseudovirales de VHC à partir de ladite cellule.
- 2) Procédé d'obtention de particules pseudovirales de VHC, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression, dans une cellule d'insecte, d'une séquence nucléotidique comprenant, d'amont en aval :
- une séquence non-codante choisie parmi une séquence (a') ou (a''') telles que définies dans la revendication 1 ;
  - une séquence (b) telle que définie dans la revendication 1 ;
- et la récolte des particules pseudovirales de VHC à partir de ladite cellule ou de son milieu de culture.
- 3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la séquence (b) code au moins pour les protéines C, E1, E2 et p7 d'un VHC.
- 4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite séquence (b) code en outre pour une partie de la protéine non structurale NS2 d'un VHC.

5) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'expression dans ladite cellule d'insecte est effectuée en utilisant un seul vecteur d'expression contenant une cassette d'expression d'une séquence (a), (a'), (a'') ou (a''') sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur, et une cassette d'expression d'une séquence (b) sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur.

6) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'expression dans ladite cellule d'insecte est effectuée en utilisant un vecteur d'expression contenant une cassette d'expression d'une séquence (a), (a'), (a'') ou (a''') sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur, et un vecteur d'expression contenant une cassette d'expression d'une séquence (b) sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur.

7) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'expression dans ladite cellule d'insecte est effectuée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant une cassette d'expression, comprenant une séquence (a') ou (a''') suivie d'une séquence (b) placées sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur.

8) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on utilise comme vecteur d'expression un baculovirus recombinant.

9) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend l'infection d'une cellule d'insecte avec :

- un baculovirus recombinant comprenant une séquence (a') ou (a''') suivie d'une séquence (b) placées sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur dudit baculovirus ; ou bien

- un baculovirus recombinant comprenant une séquence (a), (a'), (a'') ou (a''') sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur dudit baculovirus et une séquence (b) sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur dudit baculovirus identique au premier ou différent de celui-ci, ou bien ;

- un premier baculovirus recombinant comprenant une séquence (a), (a'), (a'') ou (a''') sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur dudit baculovirus, et un second baculovirus recombinant comprenant une séquence (b) sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur dudit baculovirus ;

la culture de la cellule infectée, et la récolte des particules pseudovirales de VHC à l'issue de ladite culture, à partir de ladite cellule ou de son milieu de culture.

10 10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on effectue la récolte des particules pseudovirales après au moins 48 heures de culture, de préférence après au moins 72 heures de culture.

15 11) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'on effectue la purification des particules pseudovirales de VHC à partir d'un lysat de la cellule infectée.

20 12) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'on effectue la purification des particules pseudovirales de VHC à partir du milieu de culture des cellules infectées.

25 13) Procédé selon une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il comprend en outre le traitement dudit lysat ou dudit milieu de culture par un détergent non-ionique.

30 14) Particules pseudovirales de VHC, caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 13, et en ce qu'elles ont une nucléocapside de morphologie icosaédrique, et de diamètre de 30 nm environ.

35 15) Particules pseudovirales selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 12, et en ce que leur densité déterminée par centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose est d'environ 1,15 à 1,18 g/ml.



16) Particules pseudovirales selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par un procédé selon la revendication 13, et en ce que leur densité déterminée par centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose est d'environ 1,23 à 1,26 g/ml

17) Séquence d'acide nucléique comprenant une séquence (a') ou (a''') suivie d'une séquence (b) telles que définies dans la revendication 1.

10 18) Cassette d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 17 placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur de baculovirus.

19) Vecteur d'expression, constitué par un baculovirus recombinant comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 17 placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur dudit baculovirus.

20 20) Vecteur d'expression constitué par un baculovirus recombinant comprenant une séquence (a), (a'), (a'') ou (a''') telles que définies dans la revendication 1, sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur dudit baculovirus, et une cassette d'expression comprenant une séquence (b) telle que définie dans la revendication 1, sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur dudit baculovirus ;

25 21) Cellule d'insecte contenant une cassette d'expression selon la revendication 18.

22) Cellule d'insecte contenant une cassette d'expression comprenant une séquence (a), (a'), (a'') ou (a''') telles que définies dans la revendication 1, sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur de baculovirus, et une séquence (b) telle que définie dans la revendication 1, sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur de baculovirus.

35 23) Utilisation de particules pseudovirales de VHC selon une quelconque des revendications 14 à 16 pour la préparation d'un vaccin.

24) Utilisation de particules pseudovirales de VHC selon une quelconque des revendications 14 à 16 pour la préparation d'un réactif de diagnostic.

25) Utilisation de particules pseudovirales de VHC selon une quelconque des revendications 14 à 16 pour la préparation d'anticorps anti-VHC.

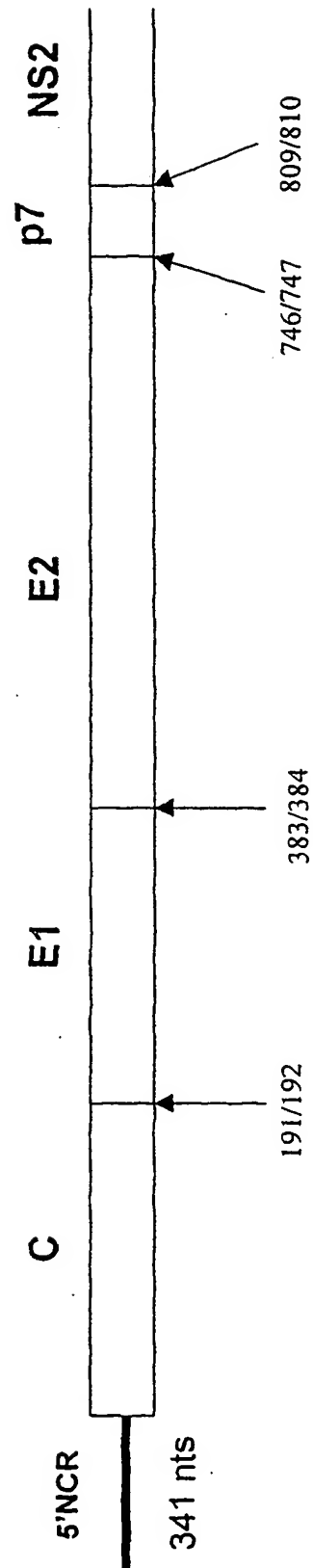


Figure 1

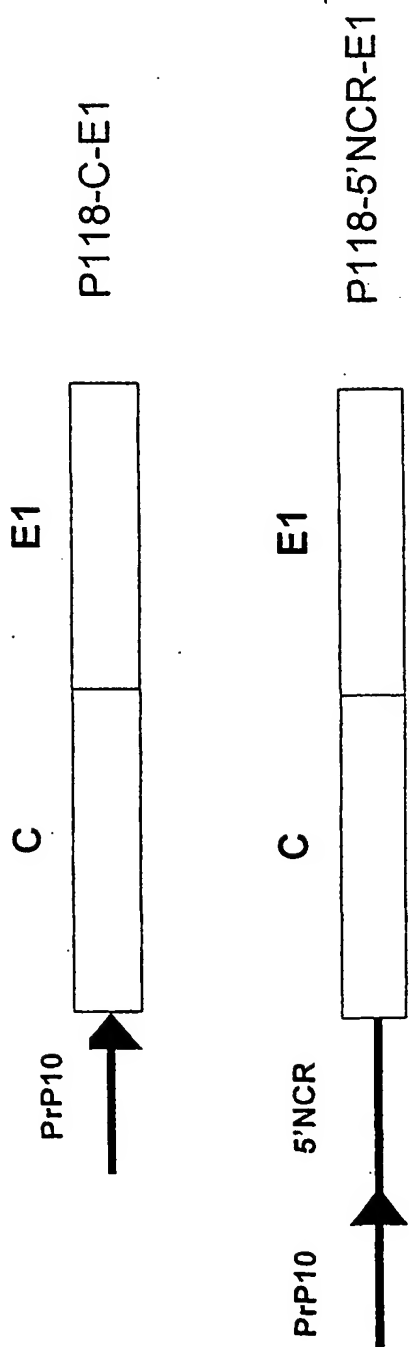


Figure 2

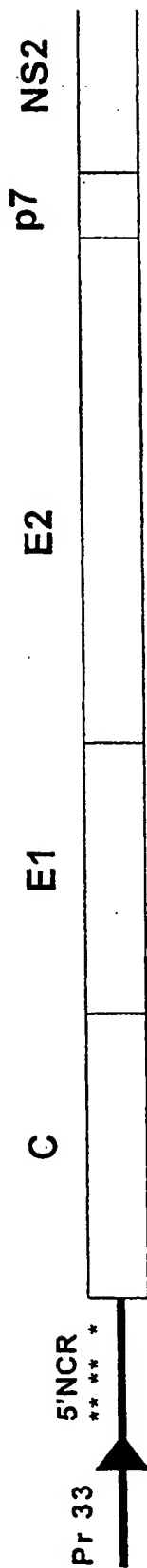


Figure 3

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
4 avril 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/26943 A3

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 7/04.  
A61K 39/29, A61P 31/14, G01N 33/569

(FR). DEVAUCHELLE, Gérard [FR/FR]: 137, chemin  
de l'Espervette, F-30380 SAINT-CHRISTOL-LEZ-ALES  
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/03012

(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.:  
CABINET ORES, 6, avenue de Messine, F-75008 PARIS  
(FR).

(22) Date de dépôt international :

28 septembre 2001 (28.09.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(81) États désignés (*national*) : CA, US.

(26) Langue de publication :

français

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, TR).

(30) Données relatives à la priorité :

00/12399 29 septembre 2000 (29.09.2000) FR

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US)  
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]: 147, rue de l'Uni-  
versité, F-75007 PARIS (FR). CENTRE NATIONAL DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]:  
3, rue Michel-Ange, F-75016 PARIS (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 16 mai 2002

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CERUTTI,  
Martine [FR/FR]: 2997, route de Montèze, F-30380  
SAINT-CHRISTOL-LEZ-ALES (FR). GIRARD, Chris-  
tel [FR/FR]: 3, rue des Coquelicots, F-67230 ROSSFELD

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

WO 02/26943 A3

(54) Title: PRODUCTION OF VIRUS-LIKE HCV PARTICLES IN THE CELLS OF INSECTS

(54) Titre : PRODUCTION DE PARTICULES PSEUDOVIRALES DE VHC EN CELLULES D'INSECTES

(57) Abstract: The invention concerns the production of virus-like particles of the hepatitis C virus, by expressing, in the cells of insects, the 5' non-coding region and the sequences coding for structural proteins of said virus in conditions not allowing the translation of the sequences coding for the structural proteins from an initiation codon of the 5' non-coding region.

(57) Abrégé : L'invention concerne la production de particules pseudovirales du virus de l'hépatite C, par expression, en cellules d'insectes, de la région 5' non-codante et des séquences codant pour les protéines structurales dudit virus dans des conditions ne permettant pas la traduction des séquences codant pour les protéines structurales à partir d'un codon d'initiation de la région 5' non-codante.

Internal Application No.

PCT/FR 01/03012

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C12N7/04 A61K39/29 A61P31/14 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

#### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WANG Y -H ET AL: "EXPRESSION AND INTERACTION OF THE HEPATITIS C VIRUS STRUCTURAL PROTEINS AND THE 5 UNTRANSLATED REGION IN BACULOVIRUS INFECTED CELLS" ARCHIVES OF VIROLOGY,US,NEW YORK, NY, vol. 142, 1997, pages 2211-2223, XP000783967 ISSN: 0304-8608 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>WO 98 21338 A (US HEALTH ;LIANG T JAKE (US); BAUMERT THOMAS F (US)) 22 May 1998 (1998-05-22) cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2002

Date of mailing of the international search report

12/03/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niemann, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/03012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAUMERT THOMAS F ET AL: "Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 5, March 1998 (1998-03), pages 3827-3836, XP002167716 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document ---	
A	SHIMOIKE T ET AL: "INTERACTION OF HEPATITIS C VIRUS CORE PROTEIN WITH VIRAL SENSE RNA AND SUPPRESSION OF ITS TRANSLATION" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 9718-9725, XP000946997 ISSN: 0022-538X the whole document -----	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03012

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9821338	A	22-05-1998	AU 738585 B2 20-09-2001
		AU 2347997 A	03-06-1998
		EP 0941337 A1	15-09-1999
		JP 2001504337 T	03-04-2001
		WO 9821338 A1	22-05-1998
<hr/>			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No

PCT/FR 01/03012

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N7/04 A61K39/29 A61P31/14 G01N33/569

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WANG Y -H ET AL: "EXPRESSION AND INTERACTION OF THE HEPATITIS C VIRUS STRUCTURAL PROTEINS AND THE 5 UNTRANSLATED REGION IN BACULOVIRUS INFECTED CELLS" ARCHIVES OF VIROLOGY, US, NEW YORK, NY, vol. 142, 1997, pages 2211-2223, XP000783967 ISSN: 0304-8608 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>WO 98 21338 A (US HEALTH ; LIANG T JAKE (US); BAUMERT THOMAS F (US)) 22 mai 1998 (1998-05-22) cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 février 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/03/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Niemann, F

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BAUMERT THOMAS F ET AL: "Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 5, mars 1998 (1998-03), pages 3827-3836, XP002167716 ISSN: 0022-538X cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>SHIMOIKE T ET AL: "INTERACTION OF HEPATITIS C VIRUS CORE PROTEIN WITH VIRAL SENSE RNA AND SUPPRESSION OF ITS TRANSLATION" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 12, décembre 1999 (1999-12), pages 9718-9725, XP000946997 ISSN: 0022-538X le document en entier</p> <p>-----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/03012

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9821338 A	22-05-1998	AU	738585 B2	20-09-2001
		AU	2347997 A	03-06-1998
		EP	0941337 A1	15-09-1999
		JP	2001504337 T	03-04-2001
		WO	9821338 A1	22-05-1998
<hr/>				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**